

分类号 R735.7

密级

U D C 617

编号 57981

厦 门 大 学

博 士 后 研 究 工 作 报 告

人肝癌多药耐药细胞 **MAPK** 激酶表达与活性研究

闫 峰

工作完成日期 2009 年 3 月

报告提交日期 2009 年 4 月

厦门大学

2009 年 4 月

人肝癌多药耐药细胞 MAPK 激酶表达与活性研究

Expression and activity of MAPK kinases in
human hepatocellular carcinoma multidrug resistance cell lines

博 士 后 姓 名 闫 峰

流动站（一级学科）名称 生物学

专 业（二级学科）名称

研究工作起始时间 2006 年 12 月

研究工作期满时间 2009 年 4 月

厦 门 大 学

2009 年 4 月

厦门大学博士后研究工作报告著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（☐）， 2、不保密（☒）
纸本在 年解密后适用本授权书；
电子版在 年解密后适用本授权书。
（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

内 容 摘 要

研究背景和目的:

多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 细胞的存在是肝癌化疗失败的根本原因。研究显示, 抗肿瘤药物能够引起丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 信号传导系统的激活及 MDR 的产生, 而通过调节肿瘤细胞 MAPK 激酶系统的表达有可能逆转 MDR。本课题拟采用阿霉素和 5-氟尿嘧啶诱导建立多株稳定的 MDR 肝癌细胞模型, 并对肝癌细胞 (MDR⁺/MDR⁻细胞) 中 MAPK 表达谱进行研究, 旨在深入探讨 MAPK 家族成员的表达与活性对肝癌细胞 MDR 的影响, 期望能为 MAPK 作为逆转治疗肝癌细胞 MDR 的分子靶点提供理论依据。

方 法:

采用药物浓度梯度递增诱导法诱导亲本细胞建立人肝癌多药耐药细胞系 HepG2/ADM、SMMC7721/ADM 和 BEL-7402/5-FU, MTT 法测定其多药耐药性。流式细胞仪分析细胞周期并检测多药耐药相关蛋白 P-gp (P-glycoprotein) 和 MRP1 (multidrug resistant protein 1) 表达。荧光定量 PCR 检测人肝癌多药耐药细胞和亲本细胞中 MAPK 关键激酶的 mRNA 表达, western-blot 检测 MAPK 关键激酶蛋白表达及其磷酸化水平。采用 MAPK 通路磷酸化抗体芯片筛选人肝癌多药耐药细胞 HepG2/ADM 和 BEL-7402/5-FU 与亲本细胞间差异表达的 MAPK 信号转导通路蛋白。

结 果:

MTT 检测发现, 诱导建立的 HepG2/ADM、SMMC7721/ADM 和 BEL-7402/5-FU 细胞不仅对各自的诱导药物 ADM 及 5-FU 存在耐药性, 而且对其它多种化疗药物均存在耐药性。与亲本细胞相比较, 人肝癌多药耐药细胞 P-gp 表达量显著增高, 而 MRP1 的表达并无显著变化。细胞周期分析显示, HepG2/ADM 细胞 G2/M 期细胞分布比率明显增高, SMMC7721/ADM 细胞 S 期比率明显增高, 而 BEL7402/5-FU 细胞 G0/G1 期比率明显增高伴随有 S 期比率

明显降低。实时荧光定量 PCR 检测发现人肝癌多药耐药细胞和亲本细胞中均可检测到 ERK1、ERK2、JNK1、JNK2、JNK3、P38 α 、P38 β 、P38 γ 、P38 δ 及 ERK5 mRNA 表达，它们在 BEL-7402/5-FU 和 SMMC7721/ADM 中的表达水平全部是显著降低的，但在 HepG2/ADM 中，除 P38 δ mRNA 表达无差异外，其余 9 种 MAPK 关键激酶的 mRNA 表达都是增高的。Western-blot 检测显示，MAPK 关键激酶的蛋白表达水平变化多样，其蛋白磷酸化水平相对一致；*p*-ERK1 及 *p*-ERK2 蛋白在 HepG2/ADM 和 SMMC7721/ADM 中的表达水平明显降低，但在 BEL-7402/5-FU 中的表达水平增高；*p*-JNK1 和 *p*-JNK2/3 蛋白表达水平在 SMMC7721/ADM 中明显降低，但在 HepG2/ADM 和 BEL-7402/5-FU 中没有明显变化；*p*-ERK5 蛋白表达在 HepG2/ADM 中无明显变化，但在 SMMC7721/ADM 和 BEL-7402/5-FU 中明显降低。MAPK 通路磷酸化抗体芯片检测结果显示，*p*-P38 蛋白表达在 HepG2/ADM 明显增高（约 11.8 倍），而在 BEL-7402/5-FU 则降低；在 HepG2/ADM 和 BEL-7402/5-FU 细胞中均出现同样改变的蛋白被认为是恒定的差异表达蛋白，共有 12 个蛋白，占 MAPK 通路磷酸化抗体芯片总蛋白数的 6.49%，可能为人肝癌多药耐药细胞与亲本细胞间的差异表达蛋白。其中表达升高的蛋白有 1 个，表达降低的蛋白有 11 个，涉及 MAPK 通路上游激活物、MAPK 上游激酶以及下游底物等多个水平。

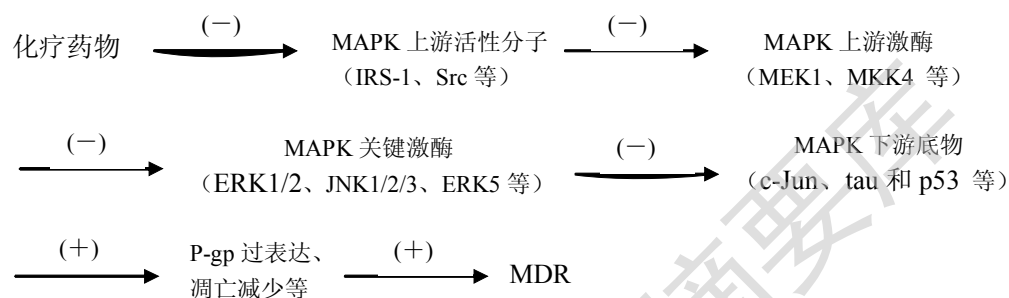
结 论：

（1）采用药物浓度梯度递增诱导法成功建立人肝癌多药耐药细胞系 HepG2/ADM、SMMC7721/ADM 和 BEL-7402/5-FU；与亲本细胞相比较，人肝癌多药耐药细胞系细胞周期分布发生改变，这种改变不仅与耐药肿瘤细胞的增殖能力降低有关，而且可能是多药耐药产生的机制之一；P-gp 参与了人肝癌多药耐药细胞系药物转运泵介导的耐药机制，而 MRP1 与之无关。

（2）MAPK 关键激酶在人肝癌多药耐药细胞和亲本细胞中均普遍表达；对于 P-gp 介导 MDR 的人肝癌细胞多药耐药细胞，MAPK 关键激酶在基因水平、蛋白水平以及蛋白磷酸化水平的表达变化趋势并不一致；多数情况下，ERK1、ERK2、JNK1、JNK2、JNK3 和 ERK5 的活性与 MDR 间呈负相关，但 P38 活性表达与 MDR 是正相关或负相关，尚需深入研究加以明确。

(3) 蛋白芯片能够成功筛选出人肝癌多药耐药细胞和亲本细胞间差异表达的 MAPK 信号转导通路蛋白 (12 种), 为进一步深入探讨肝癌 MDR 的发生机制、寻找逆转治疗靶点提供了线索。国内外文献未见报道。

(4) 结合相关文献, 我们认为人肝癌多药耐药发生的可能分子机制如下:



但这些 MAPK 关键激酶及差异表达的 MAPK 信号转导通路蛋白能否作为逆转肝癌 MDR 的靶点, 还需我们正在进行中的系列研究去证实。

【关键词】肝癌; 多药耐药; 丝裂原活化蛋白激酶; P-糖蛋白;

多药耐药相关蛋白; 蛋白芯片;

Abstract

Background:

Multidrug resistance (MDR) is almost constantly expressed in hepatocellular carcinoma (HCC) and represents one of the major problems for cancer eradication by limiting the efficacy of chemotherapy. Modulation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) activation will probably be a new method to reverse the MDR. The aim of this research was to establish several MDR HCC cell lines by exposing parental cells to stepwise increasing concentrations of adriamycin (ADM) or fluorouracil (5-FU), then detect the expression of MAPKs in MDR cells and parental cells and explore the role of MAPKs in HCC MDR, intending to provide the theoretical instructions for the reverse of HCC MDR by targeting MAPKs.

Methods:

MDR HCC cell lines, HepG2/ADM, SMMC7721/ADM and BEL-7402/5-FU, were developed by exposing parental cells to stepwise increasing concentrations of ADM or 5-FU. MTT assay was used to determine drug sensitivity. Flow cytometry was employed to analyze cell cycle distribution and measure cell P-glycoprotein (P-gp) and multidrug resistant protein 1 (MRP1) expression levels. MAPKs mRNA expression levels were measured by quantitative real-time PCR (QRT-PCR). Expression and phosphorylation of MAPKs were analyzed by Western blot. Difference in protein phosphorylation of MAPK pathway between HepG2/ADM and BEL-7402/5-FU cells and their parental cells was identified by MAPK Pathway Phospho Antibody Array.

Results:

MTT assay showed that HepG2/ADM, SMMC7721/ADM and BEL-7402/5-FU were resistant not only to ADM or 5-FU, but also to multiple anticancer drugs. Compared with parental cells, the P-gp expression was much higher in MDR HCC

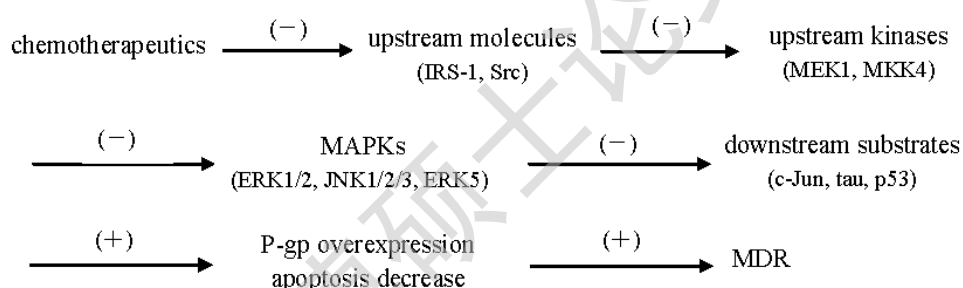
cells; however, the MRP1 expression was not significantly higher. In addition, the percentage of HepG2/ADM cells was significantly increased in the G2/M phase, and the percentage of SMMC7721/ADM cells was significantly increased in the S phase, and the percentage of BEL7402/5-FU cells was significantly increased in the G0/G1 phase accompany with decreased in the the S phase. QRT-PCR analysis demonstrated that ERK1, ERK2, JNK1, JNK2, JNK3, P38 α , P38 β , P38 γ , P38 δ and ERK5 mRNA expression decreased significantly in BEL-7402/5-FU and SMMC7721/ADM cells, however, all of them increased significantly in HepG2/ADM cells except that P38 δ mRNA expression was no significantly change. Western-blot analysis manifested that MAPKs protein expression were diverse in MDR HCC cells, but phosphorylation of MAPKs were relatively in similar tendency; in brief, phosphorylation of ERK1 and ERK2 decreased significantly in HepG2/ADM and SMMC7721/ADM but increased in BEL-7402/5-FU cells; phosphorylation of JNK1 and JNK2/3 decreased significantly in SMMC7721/ADM but were no significantly change in HepG2/ADM and BEL-7402/5-FU cells; phosphorylation of ERK5 decreased significantly in SMMC7721/ADM and BEL-7402/5-FU but was no significantly change in HepG2/ADM cells. The results of MAPK Pathway Phospho Antibody Array detection demonstrated that phosphorylation of P38 increased significantly in HepG2/ADM (over 11.8 fold) but decreased in BEL-7402/5-FU cells; 12 proteins (6.49%) were identified to be differently expressed in similar tendency in both HepG2/ADM and BEL-7402/5-FU cells compared with that in parental cells, including 1 up-regulated protein and 11 down-regulated proteins which were implicated in upstream or downstream of MAPKs in the MAPK pathway.

Conclusion:

- (1) MDR HCC cell lines, HepG2/ADM, SMMC7721/ADM and BEL-7402/5-FU, were established successfully by exposing parental cells to stepwise increasing concentrations of ADM or 5-FU. Compared with that in the parental cells, the changes of cell cycle distribution in MDR HCC cells probably contributes to the

lower ability of proliferation, moreover, might result in the MDR. MDR of HCC cells mainly attributes to the over-expression of P-gp but not MRP1.

- (2) ERK1、ERK2、JNK1、JNK2、JNK3 and ERK5 activities are down-regulated in P-gp-mediated MDR HCC cells, however, the decreased activities are not in accordance with mRNA and protein expression. Besides, whether P38 activity is positively or negatively correlated with MDR still remains identified.
- (3) 12 differently expressed proteins between MDR HCC cells and parental cells had been successfully screened by MAPK Pathway Phospho Antibody Array, thus may provide clues in studying the molecular mechanisms of HCC MDR and exploring the targets for reversal treatment.
- (4) Considering pertinent literatures, we presumed that the possible molecular mechanisms of MDR development in HCC as follow:



However, it was remained to be confirmed through our serial research works whether those differently expressed MAPKs or proteins could be used as targets for reversal of HCC MDR.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; Multidrug resistance; MAPK;

P-glycoprotein; Multidrug resistance-associated protein; Protein array

目 录

前言	1
课题一 人肝癌细胞多药耐药模型的建立及鉴定	4
1.1 背景回顾	4
1.1.1 肿瘤细胞多药耐药模型建立方法	4
1.1.2 肿瘤化疗常用药物	5
1.1.3 小结	7
1.2 材料与方法	7
1.2.1 实验材料	7
1.2.2 实验方法	8
1.3 结果	12
1.3.1 人肝癌细胞多药耐药性的诱导	12
1.3.2 细胞多药耐药性检测	12
1.3.3 细胞周期分析	12
1.3.4 多药耐药蛋白 P-GP 和 MRP1 的表达	14
1.4 讨论	15
1.5 结论	18
课题二 MDR ⁺ /MDR ⁻ 肝癌细胞 MAPK 激酶的表达	19
2.1 背景回顾	19
2.1.1 肿瘤多药耐药发生机制	19
2.1.2 肿瘤多药耐药逆转研究	24
2.1.3 MAPK 信号转导通路与肿瘤多药耐药	27
2.1.4 小结	30
2.2 材料与方法	31
2.2.1 实验材料	31
2.2.2 实验方法	32

2.3 结果	39
2.3.1 MAPK 通路关键激酶基因 mRNA 的表达	39
2.3.2 MAPK 通路关键激酶蛋白表达及活性（磷酸化水平）	42
2.4 讨论	45
2.4.1 肿瘤多药耐药与细胞信号转导	45
2.4.2 MAPK 关键激酶在人肝癌 MDR 细胞中的表达	48
2.5 结论	52
课题三 蛋白芯片筛选人肝癌多药耐药细胞和亲本细胞间 差异表达的 MAPK 信号转导通路蛋白	53
3.1 背景回顾	53
3.1.1 基因表达分析	53
3.1.2 DNA 芯片	54
3.1.3 组织芯片和细胞芯片	55
3.1.4 糖原组学	57
3.1.5 蛋白质芯片	57
3.1.6 小结	64
3.2 材料和方法	64
3.2.1 实验材料	64
3.2.2 实验方法	65
3.3 结果	68
3.3.1 荧光信号扫描图	68
3.3.2 P38 蛋白表达及活性（磷酸化水平）	69
3.3.3 差异表达的 MAPK 通路磷酸化蛋白	69
3.3.4 HepG2/ADM 和 BEL-7402/5-FU 细胞中 表达变化相同的 MAPK 通路蛋白	72
3.4 讨论	73
3.4.1 P38 蛋白活性表达与人肝癌细胞多药耐药	73

3.4.2 检测到的差异表达的 MAPK 通路蛋白	74
3.4.3 本课题创新性及今后努力方向	79
3.5 结论	80
致 谢	81
参考文献	82
附 录	114
附 图	117
博士后工作期间的研究成果	153

前 言

肝癌是世界范围高发恶性肿瘤,在肝癌的综合治疗中,化疗是重要方法之一,但效果较差。多药耐药(multidrug resistance, MDR)细胞的存在是肝癌化疗失败的根本原因,因此,如何较满意地解决肝癌细胞 MDR 问题已成为当务之急^[1]。

MDR 是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药产生耐药性的同时,对其他多种结构不同和作用靶位不同的抗肿瘤药物也产生耐药性。MDR 在临床肿瘤治疗中已普遍存在,成为目前肿瘤化疗的主要障碍之一^[2]。P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein, MRP)及肺耐药蛋白(lung resistance protein, LRP)的过度表达,谷胱甘肽(glutathione, GSH)解毒系统的活化,拓扑异构酶活性降低等均是 MDR 发生的原因。目前研究表明,肝癌细胞 MDR 的产生途径包括以下几个方面:①多药耐药基因(mdr1)途径:肝癌细胞 mdr1 基因扩增,其编码的蛋白 P-gp 表达增高。P-gp 作为一种 ATP 依赖“药泵”,可将细胞内药物泵出胞外,使细胞内药量低而无法有效杀灭肿瘤细胞^[3]。②多药耐药相关基因(mrp)和肺癌多药耐药基因(lrp)途径:肝癌细胞 mrp 基因编码的 MRP 高表达,后者参与胞质囊泡运输,使细胞内药物再分布,导致核酶等重要靶点药物减少,同时能泵出负电荷药物,最终导致细胞 MDR 形成。MDR 肝癌细胞中,部分可见 lrp 表达明显增高,说明 lrp 与 MDR 有直接关系。③抗细胞凋亡信号增强途径:肿瘤细胞内抗凋亡信号增强,是 MDR 发生的重要途径^[4]。④谷胱甘肽酶系统激活途径:GSH 是 mrp 泵底物,谷胱甘肽转移酶(glutathione-s-transferase, GST)能够偶联 GSH 到化疗药物,增加药物外流,因此,肿瘤 MDR 细胞 GSH 和 GST 水平与其耐药程度呈正相关。⑤改变 DNA 拓扑异构酶途径:肝癌细胞拓扑异构酶减少或活性降低,药物靶点和 DNA 不易形成复合物,对药物敏感性下降,即发生 MDR^[5]。

迄今报道的逆转肝癌细胞 MDR 的方法主要包括以下几个方面:①反义技术:反义技术是用载体将反义寡核苷酸导入细胞,与 mRNA 特异性结合,抑制相关基因复制及转录,在剪接、转运和翻译水平上限制相关蛋白合成,从而

使细胞 MDR 逆转^[6]。但存在一些问题，如反义核酸导入困难、非特异结合等。

②单克隆抗体封闭和免疫靶导向逆转:P-gp 单克隆抗体与 MDR 肿瘤细胞共培养，能逆转肿瘤 MDR，但单克隆抗体细胞毒性大，应用受限。免疫靶导向应用免疫毫微粒能包裹和缓释药物，在细胞内释放药物而逆转 MDR^[7]。

③化学药物逆转：化学药物逆转 MDR 是一传统方法，所采用的药物有钙通道阻滞剂维拉帕米(异博定)、免疫调节剂环孢菌素 A 等，可以逆转 *mdr1* 相关的肿瘤 MDR，但对 *mrp* 介导的 MDR 细胞仅有部分逆转作用或相对无效^[8]。

④修饰正常细胞，相对逆转 MDR：逆转录病毒介导 *mdr1* 转染骨髓并表达，提高骨髓细胞对药物的耐受，可进行大剂量和多次化疗来提高疗效，但只是相对实现对肿瘤 MDR 的逆转。由此可见，肝癌 MDR 逆转尚无适当的有效方法。

近年来，生物制剂、基因疗法等现代医学产物显示出的广阔前景已受到全世界医学界普遍重视，在许多领域已取得了可喜的成果。通过基因手段增加肝癌细胞对药物的敏感性，提高正常细胞对药物的耐受力，成为当今肝癌 MDR 逆转研究的重要方向。为实现以上目标，首要的工作必须找到能够有效逆转肝癌 MDR 的分子作用靶点。

肝癌细胞发生 MDR 过程中所涉及的各种细胞生理活动，需要依赖于细胞内信号传导系统与多种激酶系统的激活。研究显示，抗肿瘤药物能够引起丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinases , MAPKs）信号传导系统的激活及 MDR 的产生^[9]。MAPK 是哺乳动物细胞内广泛存在的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。MAPK 信号传导通路采用高度保守的三级激酶级联传递信号：细胞外刺激通过某些环节使 MKKK（MAP kinase kinase kinase）激活，转而激活 MKK（MAP kinase kinase），然后通过双位点磷酸化激活 MAPK。激活的 MAPK 可通过磷酸化转录因子、细胞骨架相关蛋白、酶类等多种底物来调节多种细胞生理过程^[10]。

由于 MAPK 通路在调节肿瘤细胞增值、侵袭及生存等方面发挥着重要作用，因而 MAPK 能否成为肿瘤治疗或干预作用靶点一直都是研究的热点问题。药物制剂可以抑制 MAPK 通路内的多种激酶和鸟苷三磷酸酶（GTPases）^[11,12]。细胞外信号调节激酶（extracellular-signal regulated protein kinase, ERK）是经典的 MAPK 家族成员，包括 ERK1 和 ERK2 两种亚型^[13]。活化的 ERK1/2 参与

胚胎形成、细胞增殖、肿瘤转化以及凋亡等过程^[14]。近来研究报道发现 ERK 通路调控 MDR1 基因转导的人乳腺癌多药耐药细胞株 MCF-7/MDR 和 MDA-MB-231/MDR 内 P-gp 的表达^[15]。此外,另有一些研究表明调节 ERK 活性能够逆转前列腺癌、胃癌及血液系统肿瘤的多药耐药性^[16-19]。ERK5 信号途径是 MAPK 家族中的重要组成部分,也是 MAPK 信号转导通路中相对较新的一条通路^[20],有关 ERK5 与化疗耐药性关系的报道很少。对于 c-Jun 氨基端激酶(c-Jun amino-terminal kinase, JNK)和 P38 MAPK,一些研究发现,它们的激活程度与肿瘤化疗的敏感性存在正相关,而另一些研究却发现它们的持续激活与肿瘤细胞的耐药性正相关^[21-24]。这种截然相反的结果可能是由于 MAPK 功能具有细胞类型和条件依赖性的特点所导致^[25-27]。以上研究结果表明,MAPK 与肿瘤细胞的耐药性密切相关。但目前缺乏有关 MAPK 信号传导通路与肿瘤细胞耐药性相互关系的系统研究;MAPK 激酶系统中哪些成员参与了耐药肿瘤细胞的信号传导尚不明确,其意义尚不肯定;MAPK 通路的激活是肿瘤细胞 MDR 基因表达的下游事件还是偶然的伴随事件也不清楚。这些是肿瘤耐药性研究中亟待解决的问题。

MAPK 信号传导通路在肿瘤化疗耐药中的作用正越来越受到重视,目前已经发现了一些能够特异性阻断 MAPK 信号传导通路的药物。有迹象表明,通过调节肿瘤细胞 MAPK 激酶系统的表达有可能逆转 MDR,成为逆转 MDR 的新方法^[28]。实验发现,化疗药物可以诱导体外培养的肿瘤细胞产生耐药性,形成稳定的耐药细胞株,为体外研究肿瘤细胞多药耐药机制提供了细胞学模型^[29]。

本课题拟采用阿霉素(adriamycin, ADM)和 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)诱导建立多株稳定的 MDR 肝癌细胞模型,并对肝癌细胞(MDR⁺/MDR⁻细胞)中 MAPK 表达谱进行研究,旨在深入探讨 MAPK 家族成员的表达与活性对肝癌细胞 MDR 的影响,期望能为 MAPK 作为逆转治疗肝癌细胞 MDR 的分子靶点提供理论依据。目前尚未见类似报道。

课题一 人肝癌细胞多药耐药模型的建立及鉴定

1.1 背景回顾

1.1.1 肿瘤细胞多药耐药模型建立方法

肿瘤细胞多药耐药模型的建立是研究 MDR 发生机制和逆转策略的重要手段。可以说,目前已知的 MDR 机制几乎都首先在耐药细胞株中发现,而后在临床病人中得到证实的。自 1970 年, Bielder 等^[30]首次报道肿瘤对药物的多药耐药性(multi-drug resistance, MDR)现象后,国内外已建立了许多耐药细胞系。迄今为止,已产生多种诱导耐药、建立耐药细胞系的方法,基因转染法^[31]和药物诱导法^[32]是目前体外建立耐药细胞株最常使用的两种方法,前者所建立的耐药细胞株其耐药机制较为单一,适用于药物靶点的筛选研究;后者是进行体外药物筛选肿瘤细胞 MDR 模型的常用方法。两种方法各有其优缺点,究竟哪种模型,更能准确反映临床耐药的形成过程,目前学者们对此尚无一致认识。

基因转染法即将一种或多种已知的多药耐药相关基因导入对化疗药物敏感的肿瘤细胞,从而获得一种耐药机制较为明确的耐药细胞模型^[33]。该方法将多药耐药单一基因导入肿瘤细胞,使其产生耐药,方法简单、省时、技术成熟,由此方法建立的多药耐药细胞系机理单一,其生物学特性和药物敏感性与传统的药物诱导法产生的多药耐药细胞系相同,稳定性较好,不易发生耐药性的丢失。目前,已有多种肿瘤细胞导入 *mdr1* 建立耐药细胞系的报道,如 Findling-Kagan 等^[34]将人 MDR1 cDNA 通过逆转录病毒导入小鼠 T 淋巴细胞瘤 ML-1 细胞株后,使得该细胞出现了以 P-gp 过度表达为特征的耐药表型。樊爱琳等^[35]利用逆转录病毒转染法将 *mdr1* 全长基因转入大鼠鳞状细胞癌 CRBH-7919 细胞系中,建立了高效、稳定的多药耐药细胞系,其对多种抗肿瘤药的耐药性提高约 9 倍, P-gp 表达明显增加;顾玲等^[36]将导入白血病细胞 K562 构建的耐药细胞,高表达 P-gp,并明显表现出对化疗药的耐药性;潘进勇等^[37]利用逆转录病毒载体将 *mdr1* 全长基因导入人膀胱癌细胞后,其 P-gp 表达明显增加,其对多种抗肿瘤药的耐药性提高 8-21 倍;章小平等^[38]将全长 *mrp1*

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库